Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Düsseldorf

Direktor : Prof . Dr . med . W . Hort

Immunhistochemische Darstellung adrenerger Herznerven

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Claudia Borchard-Tuch

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0092

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Düsseldorf

Direktor : Prof . Dr . med . W . Hort

Immunhistochemische Darstellung adrenerger Herznerven

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Claudia Borchard-Tuch

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. H. T. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. med.
F. Borchard

Korreferent
gez.: Prof. Dr. med.
E. Noack

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Immunhistochemie	1
1.1.1.	Historische Aspekte	1
1.1.2.	DBH	3
1.2.	Aufgabenstellung der Arbeit	3
2.	Material und Methoden	5
2.1.	Prinzip	5
2.1.1.	Immunfluoreszenz	5
2.1.2.	PAP-Methode	5
2.2.	Antigen	6
2.2.1.	DBH	7
2.2.2.	Chromaffine Granula	7
2.3.	Primärantikörper	8
2.3.1.	Züchtung	8
2.3.2.	Spezifitätskontrolle der Antisera	9
2.4.	FITC-Methode	11
2.4.1.	Material	11
2.4.2.	Puffer	12
2.4.3.	Konzentrationen	12
2.4.4.	Antikörperinkubation	12
2.4.5.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	12
2.5.	PAP-Methode	13
2.5.1.	Prinzip	13
2.5.2.	Material	14
2.5.3.	Kryostatschnitte	14

		Seite
2.5.4.	Paraffinschnitte	14
2.5.5.	Blockade der endogenen Peroxidase	16
2.5.6.	Spezifitätskontrolle der Antisera	16
2.5.7.	Vorversuch	17
2.5.8.	Antikörperinkubation	17
2.5.9.	Carbazol-Reaktion	19
2.5.10.	Diaminobenzidin-Reaktion	21
3.	Befunde	23
3.1.	Spezifitätskontrolle des Primärantikörpers	23
3.2.	Immunreaktivität der Gewebe mit verschiedenen Kaninchensera	27
3.2.1.	Antigen: DBH	27
3.2.2.	Antigen: chromaffine Granula, Phäochromocytom	27
3.2.3.	Antigen: chromaffine Granula, Sympathicusganglion	27
3.3.	Allgemeine morphologische Befunde	27
3.3.1.	Herz	27
3.3.2.	Nebennierenmark	28
3.3.3.	Phäochromocytom	28
3.4.	Unspezifische Reaktionen	28
3.5.	FITC-Methode	28
3.5.1.	Ratte	28
3.5.2.	Meerschweinchen	29
3.5.3.	Rind	30
3.5.4.	Mensch	31
3.5.5.	Autofluoreszenz	33

		Seite
3.6.	PAP-Methode	33
3.6.1.	Spezifitätskontrolle der Antisera	33
3.6.2.	Vorversuch	34
3.6.3.	Kryostatschnitte	35
3.6.4.	Paraffinschnitte	38
3.6.5.	Pronasetechnik	38
3.6.6.	Blockade der endogenen Peroxidase	38
3.6.7.	Konzentrationen	39
4.	Diskussion	40
4.1.	Antigen	40
4.1.1.	DBH	40
4.1.2.	Chromaffine Granula	41
4.2.	Primärantikörper	42
4.2.1.	Spezifität	42
4.2.2.	Kreuzantigenität	42
4.3.	Immunreaktivität der Gewebe mit verschiedenen Kaninchensera	45
4.4.	Allgemeine morphologische Befunde	45
4.4.1.	Herz	45
4.4.2.	NNM	46
4.5.	PAP- und FITC-Methode	47
4.6.	Darstellbarkeit postmortal	48

		Seite
4.7.	PAP-Methode	48
4.7.1.	Reaktivität der Antisera	48
4.7.2.	Vorversuch	49
4.7.3.	Kryostat- und Paraffinschnitte	49
4.7.4.	Fixiermittel	50
4.7.5.	Pronasetechnik	50
4.7.6.	Blockade der endogenen Peroxidase	51
4.7.7.	Konzentrationen	52
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1. Immunhistochemie

1.1.1. Historische Aspekte

Im Jahre 1930 entdeckte REINER bei der Markierung eines Pneumococcenantiserums, daß die immunologische Aktivität eines kovalent gebundenen Antikörpers erhalten bleibt. Somit mußte es möglich sein, Antikörper zu lokalisieren, ohne ihre Reaktion mit dem Antigen zu blockieren.

In den nächsten Jahren begann eine intensive Suche nach geeigneten Markersubstanzen. HEIDELBERGER et al. koppelten 1933 einen Farbstoff (R-Salz-azobenzidin) an Eialbumin, und ein Jahr später gelang MARRACK die farbige Markierung eines anti-Typhus-Serums.

Eine intensivere Anfärbung wurde durch die Entdeckung der Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht. 1940 fanden CREECH und JONES ein blau fluoreszendierendes Derivat des ß-Anthryl=carbamids, das jedoch von der normalen Autofluoreszenz der Gewebe überlagert wird. Um dieser Schwierigkeit zu entgehen, entwickelten COONS et al. 1942 einen grün fluoreszendierenden Farbstoff, das Fluoresceinisothiocyanat, das sich deutlich von der Eigenfluoreszenz der Gewebe abhebt.

Als es verschiedenen Forschern (AVRAMEAS, 1969; STERNBERGER et al., 1970) gelang, Enzyme, die eine Farbreaktion kata=lysieren, kovalent an Immunglobuline zu binden, führte dies zu einem Wandel der Methode.

Der Vorteil enzymhistochemischer Techniken ist die Möglichkeit, durch Verlängerung der Reaktionszeit die Farbstoffproduktion zu erhöhen. Die große Anzahl von Substratmolekülen, die ein einziges Enzymmolekül bindet, macht sogar eine elektronenmikroskopische Untersuchung möglich.

Bisher wurden mehrere Enzyme gefunden, die sich für eine Antikörpermarkierung eignen, so zum Beispiel Alkalische Phosphatase, Glucose-Oxidase und Peroxidase (AVRAMEAS, 1969; KUHLMANN und AVRAMEAS, 1971). Die meisten Untersuchungen sind mit Meerrettichperoxidase durchgeführt worden. Die Markierung verändert die Aktivität dieses Enzyms kaum, da pro Molekül nur 1.7 Aminogruppen für die Bindung verfügbar sind (MODESTO und PESCE, 1971).

Bei Anwendung von Peroxidase können verschiedene Farbstoffe als Substrate benutzt werden. GRAHAM und KARNOVSKY entwickelten 1966 das Diaminobenzidinverfahren, das jedoch aufgrund der hohen Karzinogenität des Diaminobenzidins heutzutage durch andere Methoden abgelöst wird. Als Beispiele seien genannt: Methode mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (GRAHAM et al., 1965), Benzidinreaktion von GOLDFISCHER und ESSNER (1969) und die Methode mit 5,6-Dihydroxyindol (VAN DER PLOEG und VAN DUIJN, 1964).

Der Nachteil aller Direktmarkierungen ist eine Abschwächung der immunologischen Aktivität. Um diesen Sensibilitätsverlust auszuschließen, entwickelten MASON et al. 1969 und STERN= BERGER et al. 1970 unabhängig voneinander eine Peroxidase-anti-Peroxidase-Technik, in der sich der Antikörper in einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem PAP-Komplex verbindet. Da keiner der Antikörper eine kovalente Bindung eingeht, bezeichnete STERNBERGER seine Technik als "unmar= kierte-Antikörper-Methode".

Im weiteren Verlauf wurden zahlreiche Veröffentlichungen bekannt, die die PAP-Methode zur Darstellung verschiedener Gewebsstrukturen anwandten. Unter anderem war es möglich geworden, das Enzym Dopamin-ß-Hydroxylase enzymhistochemisch zu lokalisieren (NAGATSU, 1974; GRZANNA et al. 1978; VERHOFSTAD et al., 1979).

1.1.2. DBH

DBH wird in catecholaminhaltigen Vesikeln adrenerger Gewebe gespeichert und wandelt dort Dopamin durch Einführung einer alkoholischen Hydroxylgruppe in Noradrenalin um (BLASCHKO, 1972; STJÄRNE, 1972).

1965 gelang es FRIEDMAN und KAUFMAN, das Enzym in Reinform darzustellen. SAGE et al. entdeckten zwei Jahre später, daß DBH antigen wirken kann, und GIBB et al. stellten einen spezifischen Antikörper her.

Es können eine lösliche und eine membrangebundene Enzymform unterschieden werden, die antigenetisch jedoch identisch sind (HÖRTNAGEL et al., 1972). Während im Nerven 80-90 % des Enzyms membrangebunden sind (HÖRTNAGEL et al., 1969), sind es im Nebennierenmark nur 50 % (BELPAIRE und LADURON, 1968; HÖRTNAGEL et al., 1969; HÖRTNAGEL et al., 1972; VIVEROS et al., 1968).

Um DBH lokalisieren zu können, muß die Vesikelmembran unterbrochen sein. In intakten Vesikeln ist die gesamte DBH unerreichbar für den Antikörper (HARTMAN und UDENFRIEND, 1972; HÖRTNAGEL et al., 1972).

Da in Säugetieren kein anderer Weg der Noradrenalinbiosynthese bekannt ist, befindet sich DBH an allen Stellen, an denen Noradrenalin gebildet wird. So beinhaltet die Markierung von DBH eine spezifische Darstellung des noradrenergen Nervensystems.

1.2. Aufgabenstellung der Arbeit

Untersuchungen von BORCHARD hatten 1978 ergeben, daß die Konzentration von Noradrenalin im menschlichen Herzen nach dem Tode rasch abfällt. Dieser Abfall wird zum größten Teil durch Diffusion verursacht. Stellt man adrenerge Herznerven mithilfe der FALCKschen Methode dar, so findet sich zehn Stunden nach dem Tode lediglich eine diffuse Autofluoreszenz.

DBH, die relativ ortsbeständig und antigenetisch stabil ist, erschien uns geeignet für immunhistochemische Untersuchungen in postmortalen Geweben.

In der Hoffnung, Herznerven über einen längeren Zeitraum postmortal darstellen zu können, war das Ziel dieser Arbeit die Darstellung adrenerger Herznerven mittels FITC- und PAP-Methode.

2. Material und Methoden

2.1. Prinzip

Im ersten Schritt bindet das Gewebsantigen den spezifischen Antikörper von Spezies "a" (Primärantikörper).

Zur Herstellung des Primärantikörpers mußte zunächst das Antigen isoliert werden, gegen das der Antikörper dann gezüchtet wurde.

Im zweiten Schritt bindet der Primärantikörper einen Brückenantikörper der Spezies "b" gegen Spezies "a".

Der dritte Schritt dient der Kennzeichnung des Brücken= antikörpers.

2.1.1. Immunfluoreszenz

Zur Markierung des Brückenantikörpers wurde Fluorescein= isothiocyanat verwandt (WELLER und COONS, 1954).

2.1.2. PAP-Methode (Abb. 1)

Der Brückenantikörper bindet Immunglobulin von Spezies "a" gegen Meerrettichperoxidase. Gekoppelt an das Immun= globulin, oxidiert die Peroxidase aromatische Verbindungen, die durch Elektronenresonanz intensiv gefärbt und unlös= lich werden.

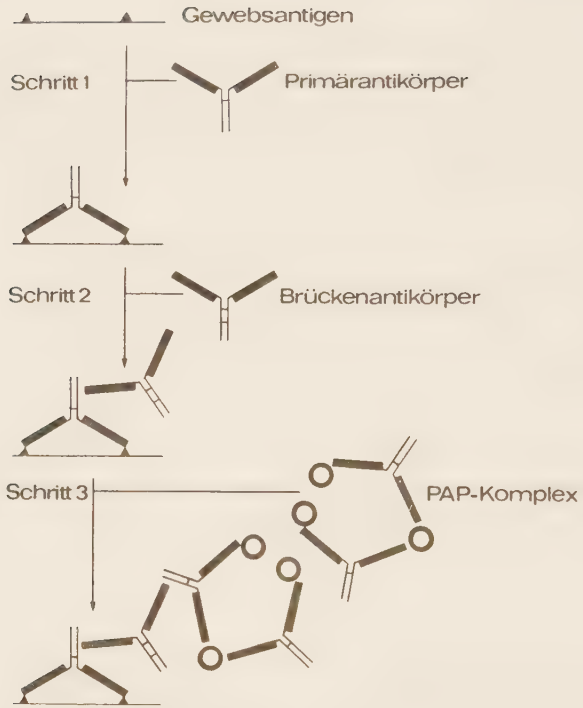

Abb. 1: Die drei Schritte der PAP-Methode (Modifiziert nach STERNBERGER, 1979)

2.2. Antigen

Das Antigen mußte Determinanten besitzen, die auch im menschlichen Herznerven vorkommen.

2.2.1. DBH

Die Versuche wurden mit heterologer DBH durchgeführt, beziehbar von der Firma Sigma (No. D-6885).

2.2.2. Chromaffine Granula

Um ein allogenetisches Antigen zu erhalten, wurden menschliche chromaffine Granula aus einem Phäochromocytom und aus einem Sympathicusganglion isoliert. Wir richteten uns nach Methoden von SMITH und WINKLER (1966) und RODA et al. (1980).

2.2.2.1. Initiales Homogenat

Die Gewebsproben des operativ entnommenen Phäochromocytoms und des Sympathicusganglions wurden in einem eisgekühlten Behälter zum Labor gebracht. Die weitere Präparation erfolgte auf einem eisgekühlten Uhrglas. Die Gewebsstücke wurden als Würfel mit einer Kantenlänge von etwa einem cm mit der Rasierklinge entnommen und in 10 ml eisgekühlte Saccharoselösung über eine Stunde eingelegt.

Die Lösung enthielt folgende Bestandteile: Saccharose 0.32 mol/l, Pargyline (N-Methyl-N-benzyl-2-propynylamin) 0.1 mmol/l und HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, pH 7.5) 10 mmol/l, alle Reagenzien beziehbar über die Firma Sigma.

Alle Schritte der folgenden Sedimentation wurden mit einer Ultrazentrifuge L5-75 Beckmann durchgeführt.

2.2.2.2. Differentialzentrifugation: rohe Granulafraktion

Das Homogenat wurde bei niedriger Geschwindigkeit (1200 g) über 10 Minuten in einem Festwinkelrotor 50 Ti Beckmann zentrifugiert, um unzerstörte Zellen und Zellkerne zu entfernen.

Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in

10 ml der oben beschriebenen Saccharoselösung homogenisiert und erneut bei 1200 g über 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand, bezeichnet mit postnuclearer Fraktion, wurde gefiltert und bei 27 000 g über 60 Minuten in einem Fest=winkelrotor 50 Ti Beckmann zentrifugiert.

2.2.2.3. Dichtegradientenzentrifugation

Der Überstand wurde einschließlich einer flockigen Schicht, die locker dem Sediment auflag, dekantiert und der Bodensatz in 3 ml eisgekühlter 0.32 M Saccharoselösung resuspendiert.

Diese Suspension wurde einem Kissen von 7.5 ml 1.6 M Saccharoselösung überlagert, so daß zwei Schichten unter=schiedlicher Dichte aneinandergrenzten. Im einzelnen enthielt die Saccharoselösung folgende Bestandteile: Saccharose 1.6 mol/l, Pargyline 0.1 mmol/l und HEPES 10 mmol/l (Firma Sigma).

Die beiden Schichten wurden vier Stunden bei 100 000 g in einem Schwingbecherrotor SW 41 Beckmann zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und die Innenseite des Bechers mit Seidenpapier gesäubert. Um eine dem Sediment locker anliegende Schicht zu entfernen, fügten wir 1.6 M Saccharoselösung hinzu und lösten die Schicht, indem wir den Becher leicht bewegten. Die Suspension wurde dekantiert und der Waschvorgang mehrmals wiederholt. Zurück blieb ein rosafarbenes Sediment chromaffiner Granula.

Wir gewannen aus dem Phäochromocytom einen Bodensatz mit einem Gewicht von 200 mg, aus dem Sympathicusganglion einen Bodensatz mit einem Gewicht von 100 mg.

2.3. Primärantikörper

2.3.1. Züchtung

Die Antikörper wurden nach einer Methode von FEUERLE in

Neuseeländer Kaninchen gezüchtet (persönliches Gespräch mit Frau Prof. HEYM, 1979).

Fünf Kaninchen (Gewicht 4000 g, 4010 g, 4080 g, 4200 g und 4370 g) wurden gegen Rinder-DBH, ein Kaninchen (Gewicht 4170 g) gegen die chromaffinen Granula des Phäochromocytoms und ein weiteres (Gewicht 3800 g) gegen die chromaffinen Granula des Sympathicusganglions immunisiert. In jede Pfote wurde subcutan ein Gemisch aus 0.1 ccm DBH bzw. 0.125 ccm Granula und 0.125 ccm komplettem Freundschen Adjuvans (DIFCO Laboratories) gespritzt.

Acht Wochen später fand in gleicher Weise eine Auffrischnungs= impfung mit inkomplettem Freundschen Adjuvans (DIFCO Laboratories) statt. Die Blutabnahme erfolgte nach einer Woche aus der Ohrarterie (4 ml pro Tier). Das Blut wurde bei 2000 u/min in einer Kühlzentrifuge (Sedvall-Superspeed-RC2-B) über 10 min zentrifugiert und das Serum in 1-ml-Eppendorfhütchen dekantiert.

2.3.2. Spezifitätskontrolle der Antisera

Um die Spezifität der Antisera zu überprüfen, wurden mehrere Doppeldiffusionstests nach OUCHTERLONY durchgeführt.

2.3.2.1. Prinzip

Antigen und Antikörper werden in benachbarte Löcher eines Gels eingelagert. Wenn sie gegeneinander diffundieren und ein optimales Antigen/Antikörper-Verhältnis erreicht ist, bilden sie eine Präzipitationslinie.

2.3.2.2. Agar

0.7 % Agarose (Firma L/Industrie biologique francaise) und 2 % Dextran T 500 (Pharmacia Uppsala) wurden in einem Puffer gelöst. Der Puffer enthielt NaCl 0.1 mol/l, Tris-HCl 0.01 mol/l; pH 7.6, und NaN_3 0.001 mol/l (alle

Reagenzien Firma Merck).

Agarose und Dextran wurden mit dem Puffer gemischt und mithilfe eines Kochrührers (Firma Jahnke und Kunkel) vollständig gelöst.

Vor dem Erkalten wurden 2 ml dieses Agars in Petrischalen mit einem Durchmesser von 3.5 cm gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, konnten die Stanzmuster mithilfe einer Stanze der Firma Boskamp geprägt werden. Die Löcher waren rosettenförmig angeordnet bei einem Durchmesser von 6 mm und einem Abstand von 3.5 mm von Rand zu Rand. Nachdem die Löcher auspipettiert waren, konnten Antigene und Anti= sera eingelagert werden.

2.3.2.3. Einlagerung

Als Antigene wurden Homogenate vom Phäochromocytom, vom Sympathicusganglion und von den aus ihnen gewonnenen chromaffinen Granula verwandt. Die etwa 0.5 ccm großen Gewebsstücke wurden mit dem Ultra-Turrax^{R} (Firma Jahnke und Kunkel) drei Minuten mit 2000 U/ min in drei ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert.

Die Antigene wurden in der Mitte des Agars in folgenden Mengen eingelagert:

Phäochromocytom 50 µl
Sympathicusganglion 50 µl
chromaffine Granula 10 µl, verdünnt mit 10 µl physiologischer Kochsalz= lösung

In die Peripherie wurden abwechselnd mit NaCl (50 µl) die Seren immunisierter Kaninchen (je 50 µl) eingebracht.

In anderen Ouchterlony-Tests stellte DBH das Antigen dar (Menge 55 µg = 10µl, verdünnt mit 10 µl NaCl. Geschätzt nach GIBB et al., 1967). Diesmal wurde das Antigen abwechselnd mit 50 µl Kaninchenserum in der Peripherie eingelagert,

während das Zentralloch lediglich mit 50 µl physiologischer Kochsalzlösung gefüllt wurde.

Zur Kontrolle diffundierte gegen jedes Antigen das Serum eines nicht sensibilisierten Kaninchens.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in feuchtem Milieu.

2.4. FITC-Methode

Die fluoreszenzmikroskopische Anfärbung der Gewebe erfolgte nach einer von HARTMAN 1973 beschriebenen Methode.

2.4.1. Material

Für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung wurde das Herzgewebe einer Ratte (225 g), eines Meerschweinchens (410 g) und eines Bullens (Herzgewicht 2750 g) verwandt. Außerdem wurden Teile eines Leichenherzens (Herzgewicht 315 g) und eines Phäochromocytoms untersucht.

Die Gewebe wurden in einem eisgekühlten Behälter zum Labor gebracht. Die weitere Präparation erfolgte auf einem eisgekühlten Uhrglas. Die Gewebsstücke wurden als Blöckchen mit einer Kantenlänge von etwa 3 mm entnommen. Mithilfe einer Kältemischung aus Kohlensäureschnee und Petroläther wurden die Gewebsproben innerhalb von drei Minuten eingefroren.

Wie frühere Untersuchungen ergeben haben (HARTMAN, 1973), führen schnellere Einfriermethoden oft zu Brüchen in den Blöckchen. Zudem konnte nicht nachgewiesen werden, daß die Darstellung adrenerger Strukturen durch schnellere Einfriermethoden verbessert wird.

Die Gewebsstücke wurden mithilfe von Tissue Tec (Firma SLEE, Mainz) im Kryostaten aufgeblockt und Schnitte von ca. 10 µm Dicke angefertigt. Es folgte eine Fixierung durch 4 % Formaldehyd in Phosphatpuffer 0.1 mol/l; pH 7.2. Um

das Fixiermittel wieder zu entfernen, wurden die Schnitte anschließend in diesem Puffer über 10 Minuten gespült.

Die folgenden Überschichtungen fanden in einem Histoinkubator (Firma Indumed) bei 37 °C und einem feuchten Milieu statt.

2.4.2. Puffer

Inkubationsmedium: Triton-x-100 (Sigma No. T-6878) 0.3 % in Sörensenpuffer

(Sörensenpuffer; pH 7.2:
Stammlösung A: KH_2PO_4 0.07 mol/l
Stammlösung B: Na_2HPO_4 x 2 H_2O 0.07 mol/l)

Waschflüssigkeit: Triton-x-100 1 % in Sörensenpuffer

2.4.3. Konzentrationen

Kaninchenserum 1 : 30
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-anti-IgG (Miles, No. 65-173) 1 : 20

2.4.4. Antikörperinkubation

Die Schnitte wurden zunächst mit Kaninchenserum über 15 Minuten inkubiert. Nach einer zehnminütigen Spülung erfolgte die FITC-Inkubation über 15 Minuten. Die Schnitte wurden gründlich über 10 Minuten gespült und in Glycerin-Bicarbonat=puffer (1:1; pH 8.6) eingedeckt.

2.4.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Als Mikroskop wurde ein Orthoplan-Mikroskop der Firma Leitz benutzt. Lichtquelle waren zwei Quecksilberhochdrucklampen HBO 200. Als Anregungsfilter wurde ein KP 490 verwandt, als Sperrfilter ein K 530.

Die frischen Fluoreszenzpräparate wurden wegen ihrer geringen

Haltbarkeit sofort mit einem Ektachrom-Highspeed-Film Din 27 (Firma Kodak) bei 125facher und 500facher Vergrößerung aufgenommen. Wegen der besseren Lichtintensität wurden die Aufnahmen mit Durchlichtfluoreszenz gemacht.

2.5. PAP-Methode

2.5.1. Prinzip (Abb. 2)

Das Kaninchenserum wurde über einen Brückenantikörper, der vom Schwein stammte und sich gegen Kaninchenserum richtete, mit einem Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex gekoppelt.

Die Peroxidase katalysierte die Elektronenabgabe von Carbazol und in einem Fall von Diaminobezidin an H_2O_2. Die Oxidationsprodukte schlugen sich als unlösliche Farbstoffe im Gewebe nieder.

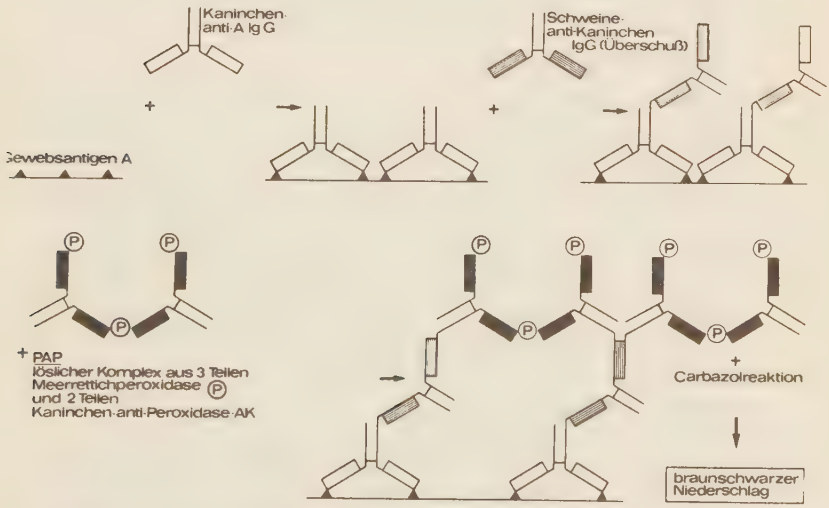

Abb. 2 Schematische Darstellung der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik

2.5.2. Material

Insgesamt wurden Gewebsproben aus Herz und Nebennierenmark von drei Wistarratten (Gewicht 205 g, 225 g und 230 g), fünf Meerschweinchen (Gewicht 315 g, 370 g, 410 g, 450 g und 470 g) und einem Rinderherzen (Gewicht 2750 g) entnommen.

Die Gewebsstücke wurden als Blöckchen mit einer Kantenlänge von etwa drei mm mit der Rasierklinge entnommen. Es wurden Kryostatschnitte und Paraffinschnitte angefertigt.

2.5.3. Kryostatschnitte

Die Proben wurden durch eine Kältemischung aus Kohlensäure-schnee und Petroläther innerhalb von drei Minuten eingefroren und mithilfe von Tissue Tec (Firma SLEE, Mainz) im Kryostaten aufgeblockt. Wir fertigten Serienschnitte von 7 µm Dicke an, die vor der Weiterverarbeitung über eine Stunde luft-getrocknet wurden. Um eine Zerstörung der Antigenstruktur zu vermeiden, ließen wir die Kryostatschnitte unfixiert.

2.5.4. Paraffinschnitte

2.5.4.1. Fixiermittel

Als Fixiermittel wurden benutzt:

2.5.4.1.1. 4 % Formaldehyd und 2.5 % Saccharose in 0.135 M Phosphatpuffer, pH 7.4 (MAUNSBACH, 1966)

Die Gewebsblöckchen wurden über 24 h bei einer Temperatur von 20 °C eingelegt. Es folgten drei Spülungen in 0.135 M Phosphatpuffer, pH 7.4 über jeweils 30 Minuten.

2.5.4.1.2. BOUINSCHE Lösung

gesättigte wäßrige Pikrinsäure 75 ml, Formalin 25 ml, Eisessig 5 ml

Der Fixiervorgang dauerte 24 Stunden bei einer Temperatur von 20 °C. Die Spülung erfolgte in 70 % Alkohol, gemischt mit fünf Tropfen 2.0 N Essigsäure, dreimal 30 Minuten.

2.5.4.2. Paraffineinbettung

Die Gewebsproben wurden über 15 Minuten gewässert und im Autotechnikon (Firma Technicon, Irland) durch ein 15minütiges Bad in 70 % Alkohol, zwei Bäder in 96 % Alkohol (zwei und eine Stunde) und zwei Bäder in absolutem Alkohol (jeweils eine Stunde) dehydriert. Die Klärung erfolgte durch drei Bäder in Toluol (1 1/2 und zweimal 1/2 Stunde).

Die Einbettung fand in zwei Paraffinbädern von zwei Stunden und einer 3/4 Stunde bei + 56 °C statt.

Es wurden Paraffinschnitte von 7 µm Dicke angefertigt und auf mit Albumin beschichteten Objektträgern aufgezogen. Vor dem Entparaffinieren wurden die Schnitte bei einer Temperatur von 80 °C über 20 Minuten im Brutschrank gelagert.

2.5.4.3. Entparaffinierung

Die Entparaffinierung erfolgte durch ein Bad in kaltem Xylol über 10 Minuten, zwei Bäder in kaltem 95 % Ethanol (je 10-15 sec) und ein Bad in destilliertem Wasser (10-15 sec).

2.5.4.4. Pronasetechnik

Die Andauung mit Pronase wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, um die Antigenstrukturen freizulegen und so die Antigen-Antikörper-Reaktion zu erleichtern (HUANG, 1975).

Alle Schritte der Pronasetechnik erfolgten in einem Histoinkubator der Firma Indumed. Die Schnitte wurden zunächst in 0.05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) mit 2.5 % Saccharose bei 20 °C über 15 Minuten gewässert. Nach einer weiteren Spülung bei 37 °C wurden die Schnitte mit 0.1 % Pronase (Sigma, No. 5-255, Typ VII) in 0.05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) bei 37 °C über zwei Stunden inkubiert (DENK et al., 1977). Die Lösung zirkulierte ständig zwischen den Schnitten, die senkrecht mit einem Abstand von fünf mm auseinanderstanden. Es folgte eine gründliche Spülung in

Tris-HCl-Puffer über fünf Stunden, wobei die Waschflüssigkeit alle 30 Minuten ausgewechselt wurde.

2.5.5. Blockade der endogenen Peroxidase

Die Oxidation der Farbstoffe durch endogene Peroxidase führt zu einer unspezifischen Anfärbung und sollte nach einer Methode von STRAUS (1971) verhindert werden.

Die Schnitte wurden über 30 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C in einer frisch angesetzten Lösung von 0.3 % H_2O_2 in Methanol (beide Artikel Firma Merck) eingetaucht. Es folgte eine Spülung über 15 Minuten in destilliertem Wasser.

Wir führten diesen Schritt nur an wenigen Schnitten durch, da die Gefahr bestand, daß auch die Peroxidaseaktivität des PAP-Komplexes blockiert wurde. Zudem hat Methanol eine fixierende Wirkung, so daß möglicherweise Antigenstrukturen zerstört werden.

2.5.6. Spezifitätskontrolle der Antisera

Um die Spezifität der in der immunhistochemischen Färbung benutzten Antisera zu überprüfen, wurden mehrere OUCHTERLONY-Tests durchgeführt.

Die OUCHTERLONY-Platten wurden in der oben beschriebenen Art angefertigt.

Das zentral eingelagerte Kaninchenserum (50 µl) diffundierte gegen Schweine-anti-Kaninchenserum-IgG (50 µl; Firma DAKO, 21-090), das abwechselnd mit 50 µl NaCl in die Peripherie eingebracht worden war.

Weitere Tests wurden mit 50 µl PAP-Komplex (Firma DAKO, Z 113) gegen 50 µl anti-Kaninchenserum-IgG durchgeführt.

2.5.7. Vorversuch

Im Vorversuch sollten unabhängig von der spezifischen Reaktivität des Primärserums bestehende Fehler festgestellt werden.

Mehreren Untersuchern war es bereits gelungen, Immunglobuline in Plasmazellen immunhistochemisch anzufärben (CURRAN und GREGORY, 1978; CURRAN und JONES, 1977; PINKUS und SAID, 1977; HALLIDAY et al.; 1977; TAYLOR und BURNS, 1974). In unserem Fall sollten Plasmazellen-Immunglobuline eines Magenfrühcarcinoms (N 10239/81 Ib) und eines Plasmocytoms dargestellt werden. Es handelte sich um Paraffinschnitte, die nach Entparaffinierung und Andauung mit Pronase in der unten beschriebenen Art histochemisch angefärbt wurden.

Folgende Verdünnungen wurden gewählt:

Schweineserum (DAKO X 901)	1 : 20
anti-Kaninchenserum-IgG	1 : 20
PAP-Komplex	1 : 50

Als Primärserum wurden Kaninchenantikörper gegen menschliche Immunglobuline (IgG, IgM und IgA) und gegen leichte Ketten (λ und $\varkappa$) in einer Verdünnung von 1 : 40 verwandt (Firma Behring).

2.5.8. Antikörperinkubation

2.5.8.1. Puffer

Trisgepufferte physiologische Kochsalzlösung

Stammlösung: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 60.5 g in 1000 ml physiologischer Kochsalzlösung; pH bei 7.4 mit Fixanal (2 Äquivalente Salzsäure) eingestellt

Diese Stammlösung wurde im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, so daß der pH auf 7.0 sank.

In diesem Puffer erfolgten Spülung und Antikörperinkubation.

2.5.8.2. Konzentrationen (Abb. 3)

Wie frühere Untersuchungen ergeben haben (BIGBEE et al., 1977), muß das Primärserum niedrig konzentriert sein. In hoher Konzentration blockiert es alle Bindungsstellen des Brückenantikörpers, so daß die nachfolgende Reaktion mit dem PAP-Komplex verhindert wird. Der Brückenantikörper dagegen muß aus diesem Grund im Überschuß vorliegen.

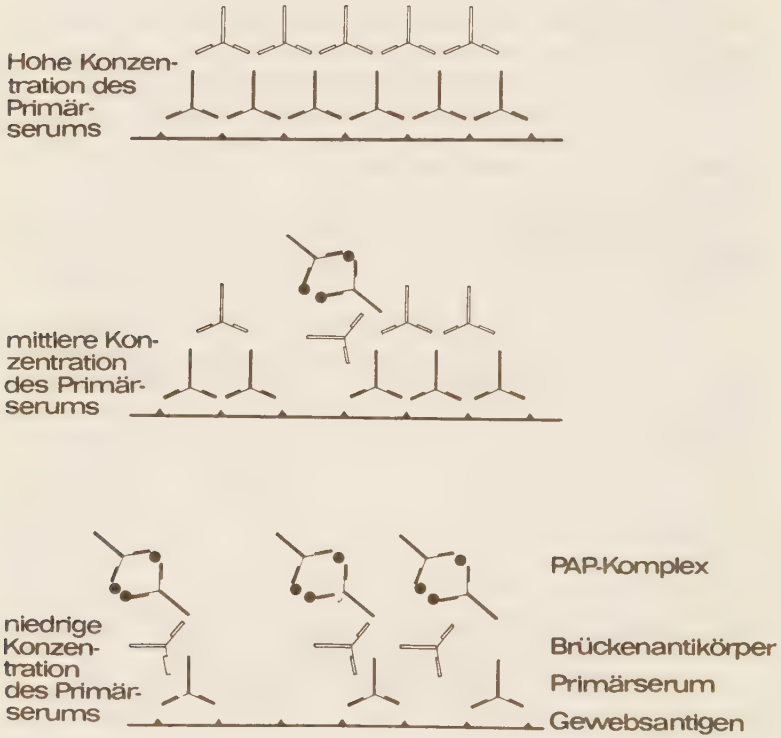

Abb. 3: Einfluß der Konzentration des Primärserums auf die Anfärbbarkeit mittels PAP-Methode (Modifiziert nach DE ARMOND et al., 1980)

Es wurden zahlreiche Versuche mit unterschiedlichen Serum=konzentrationen durchgeführt.

Folgende Verdünnungsverhältnisse wurden gewählt:

Kaninchenserum	1 : 40, 1 : 60	und	1 : 100
Brückenantikörper	1 : 10	und	1 : 20
PAP-Komplex	1 : 50	und	1 : 100
	in 1% Schweineserum		

Die folgenden Überschichtungen fanden in einem Histoinkubator der Firma Indumed bei einer Temperatur von 37 °C und feuchtem Milieu statt.

2.5.8.3 Verminderung der unspezifischen Hintergrundsfärbung (BURNS, 1975)

Um Bindungsstellen mit unspezifischer Affinität zu Immun=globulinen zu blockieren, wurden die Schnitte vor jeder Antikörperinkubation zehnminütig mit normalem Schweineserum (1 : 5 und 1 : 20) überschichtet. Nach der Inkubation wurden die Objektträger senkrecht auf Zellstoff gestellt, so daß überschüssiges Schweineserum aufgesogen wurde. Ohne Spülung erfolgte dann die Antikörperinkubation.

2.5.8.4. Antikörperinkubation

Die Schnitte wurden zunächst mit Kaninchenserum über 60 Minuten inkubiert. Es folgten eine 30minütige Spülung und eine Überschichtung mit Schweineserum. Die Schnitte wurden dann mit anti-Kaninchenserum-IgG über 60 Minuten inkubiert. Nach einer weiteren Spülung über 30 Minuten und einer Überschichtung mit Schweineserum schloß sich die PAP-Inkubation über 60 Minuten an. Die Gewebe wurden erneut gespült und dann mit Carbazol oder Diaminobenzidin angefärbt.

2.5.9. Carbazol-Reaktion (GRAHAM et al., 1965)

3-Amino-9-ethylcarbazol (Abb. 4) bildet ein rotes Reaktions=produkt.

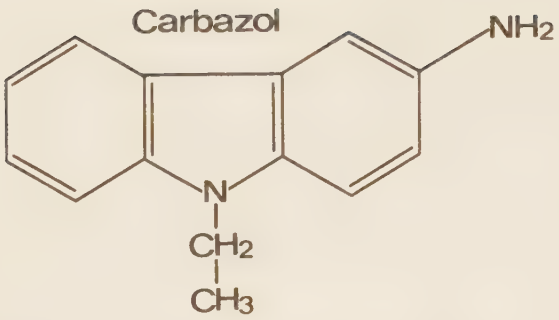

Abb. 4: 3-Amino-9-ethylcarbazol

Inkubationsmedium:

20 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol (Firma Sigma) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid (Firma Serva) gelöst. Wir fügten 100 ml Michaelispuffer hinzu und verdünnten die Lösung mit Aqua dest. auf 200 ml. Der Michaelispuffer enthielt 3 Teile Veronalnatrium (5,5-diäthylbarbitursaures Natriumsalz) 0.1 mol/l in destilliertem Wasser und 2 Teile HCl 0.1 mol/l.

Unmittelbar vor Gebrauch fügten wir 10 µl 3% H_2O_2 hinzu und inkubierten die Schnitte bei einer Temperatur von 20 °C über 30 Minuten.

Nach einer 15minütigen Spülung in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt.

Zum Eindecken verwandten wir Kaisers Glycerin-Gelatine (Firma Merck). Nichtwäßriges Eindeckungsmedium kann nicht benutzt werden, da das Reaktionsprodukt lipophil ist und sich lösen würde.

2.5.10. Diaminobenzidin-Reaktion

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Abb. 5) bildet ein braunes Reaktionsprodukt.

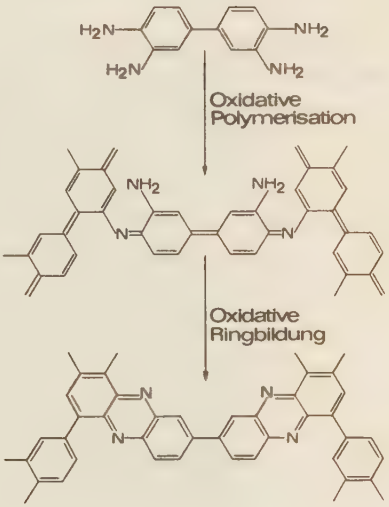

Abb. 5: Die bei der Oxidation des Diaminobenzidins frei werdenden Bindungsstellen reagieren miteinander, so daß ein unlösliches Phenazinpolymer entsteht (Modifiziert nach STERNBERGER, 1979)

Es wurde ein Diaminobenzidinverfahren in einer Modifikation nach GRAHAM und KARNOVSKY (1966) durchgeführt.

Inkubationsmedium:

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Firma Sigma)	6 mg
Tris-HCl-Puffer; pH 7.6 (Tris 0.2 mol/l 10 Teile, HCl 0.1 mol/l 15 Teile und physiologische NaCl-Lösung 15 Teile)	10 ml
H_2O_2 3% (Firma Merck)	1 Tropfen

Inkubation: 3 Minuten bei 37 °C.

Nachbehandlung: Es folgte eine Spülung in destilliertem Wasser über 15 Minuten.

Wir färbten mit Hämalaun gegen und dehydrierten die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach zwei Klärbädern in kaltem Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Da Diaminobenzidinbraun amorph und fettunlöslich ist, muß es in organischen Medien eingedeckt werden.

3. Befunde

3.1. Spezifitätskontrolle des Primärantikörpers

Mithilfe der OUCHTERLONY-Tests konnte in den Seren aller immunisierten Kaninchen eine Antikörperbildung sichtbar gemacht werden.

Abb. 6: Antikörperbildung gegen Rinder-DBH. Alle drei Kaninchen (K_1-K_3) haben Antikörper gegen die benachbarte DBH gebildet, jeweils erkennbar an zwei schmalen Linien.

Abb. 7: Antikörperbildung gegen Phäochromocytomhomogenat. Die Präzipitatbanden bestehen einmal aus einer doppelten und zweimal aus einer einzigen Linie. Während Kaninchen 1 zwei verschiedene Antikörper gebildet hat, haben die beiden anderen Kaninchen nur einen einzigen produziert.

Abb. 8: Antikörperbildung gegen Gewebe aus humanem sympathischen Grenzstrang-Ganglion. Deutlich erkennbar sind die hellen, breiten Präzipitatbanden, die relativ peripher gelegen sind.

Sowohl bei den sympathischen als auch bei den Granula des Phäochromocytoms bestehen die Präzipitatbanden aus einer einzigen (K_1) und zweimal aus einer doppelten Linie (K_2 und K_3; Abb. 9 und 10).

In allen OUCHTERLONY-Tests fehlte eine spezifische Immunreaktivität in den Seren nicht-sensibilisierter Kaninchen.

Abb. 9: Antikörperbildung gegen chromaffine Granula, Phäochromocytom

Abb 10: Antikörperbildung gegen chromaffine Granula, Sympathicusganglion

3.2. Immunreaktivität der Gewebe mit verschiedenen Kaninchen-sera

3.2.1. Antigen: DBH

War der Primärantikörper gegen Rinder-DBH gezüchtet worden, zeigte bovines Gewebe die stärkste Anfärbbarkeit. Auch beim Meerschweinchen gelang eine ausgezeichnete Darstellung, beim Menschen eine gute, wohingegen die Reaktion in Geweben der Ratte nur schwach war.

3.2.2. Antigen: chromaffine Granula, Phäochromocytom

Menschliches adrenerges Gewebe zeigte die stärkste Immun-reaktivität. Während Rind und Meerschweinchen mäßig stark reagierten, war die Anfärbbarkeit in Geweben der Ratte nur schwach.

3.2.3. Antigen: chromaffine Granula, Sympathicusganglion

Auch hier ließ sich menschliches adrenerges Gewebe am stärksten anfärben. Eine ausgezeichnete Darstellung war in Geweben von Rind und Meerschweinchen möglich, wohingegen die Ratte nur schwach reagierte.

3.3. Allgemeine morphologische Befunde

3.3.1. Herz

Alle Spezies zeigten das gleiche Verteilungsmuster. Die adrenergen Herznerven dringen in enger Nachbarschaft zu den Coronararterien in das Herz ein. Zusammen mit kleineren Gefäßästen gelangen sie in die Nähe von Muskelfasern. Sie verzweigen sich und bilden Varicositäten aus. Die Plexus-bildung ist besonders deutlich im Bereich der Vorhöfe und Herzohren erkennbar. Hier findet sich insgesamt eine größere Anzahl adrenerger Herznerven als in den Kammern. Im Vergleich zur linken Kammer ist die rechte dichter innerviert.

3.3.2. Nebennierenmark

Das NNM besteht aus dichten Nestern polygonaler Zellen, zwischen denen sinusoide Capillaren und kleinere Venen liegen.

Im wesentlichen sind drei Zellgruppen unterscheidbar: chromaffine Zellen, Saumzellen und Lipidzellen. Besonders zahlreich finden sich die chromaffinen Zellen, deren Cytoplasma DBH-speichernde Granula enthält.

In engen Kontakt zu diesen Zellen treten sympathische Nervenfasern, die das NNM durchziehen.

3.3.3. Phäochromocytom

Es findet sich epitheliales Tumorgewebe aus chromaffinen Zellen. Wie im NNM sind die Zellen in Ballen angeordnet. Größe und Form variieren. Auch die Zellkerne sind viel= gestaltig und häufig exzentrisch gelegen.

3.4. Unspezifische Reaktionen

Unspezifische Reaktionen traten in nekrotischen Zellen und epithelialen Tonofibrillen auf. Sie waren gleichermaßen nach PAP- und FITC-Färbung beobachtbar und fanden sich in Kryostat- und Paraffinschnitten. Fixierung schwächte diese unspezifische Färbung kaum.

3.5. FITC-Methode

3.5.1. Ratte

Besonders auffällig erschien die intensive nervöse Versor= gung des RLS durch plexusartig verzweigte adrenerge Fasern. Autofluoreszendierende Strukturen konnten nicht beobachtet werden; die Fluoreszenz war jedoch insgesamt relativ schwach.

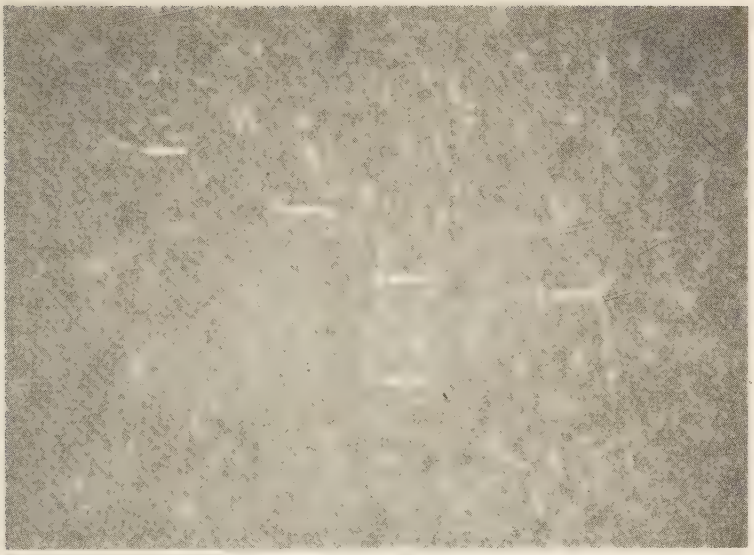

Abb. 11: Adrenerge Nerven im Vorhof des Rattenherzens. Es sind feine Fasern erkennbar, die in kurzen Abständen punktförmige Varikositäten heller Fluoreszenz bilden.

3.5.2. Meerschweinchen

Die fluoreszenzmikroskopische Anfärbung gelang sehr gut. Auch hier wies das RLS einen besonders dichten, hell fluoreszendierenden Grundplexus auf. Es konnten nicht mehr perivaskuläre Nerven als bei der Ratte beobachtet werden.

Abb. 12: Adrenerge Nerven im Kammermyocard des Meerschweinchens. Die Nervenfasern verlaufen vorwiegend parallel zu den Muskelfasern. Im Vergleich zu Vorhöfen und Herzohren sind Varicositäten etwas seltener anzutreffen. Links im Bild (c) kann man eine kleine Coronararterie erkennen, die von einem dichten noradrenergen Fasernetz umgeben ist.

3.5.3. Rind

Die Fluoreszenz, die sich im Ochsenherzen fand, war gut, so daß die adrenergen Nerven in typischer Verteilung dargestellt werden konnten.

Abb. 13: Adrenerge Nerven in der rechten Kammer des Ochsenherzens. Wie im Meerschweinchenherzen verlaufen die Nerven vorwiegend parallel zu den Muskelfasern, und Varicositäten sind im Vergleich zu Vorhöfen und Herzohren seltener ausgebildet.

3.5.4. Mensch

3.5.4.1. Herz

Auch 23 Stunden postmortal gelang bei einem menschlichen Herzen eine gute fluoreszenzmikroskopische Darstellung.

Die adrenergen Fasern verliefen parallel zum Epicard und Endocard und drangen in Begleitung der Coronararterien ins Herz ein. Hier verzweigten sie sich zwischen den Herzmuskelfasern und bildeten Varicositäten aus. Die rechte Kammer war weitaus dichter innerviert als die linke.

Das untersuchte menschliche Herz zeigte eine ausgeprägte braune Atrophie mit Lipofuszineinlagerungen. Die hierdurch erzeugte gelbliche Fluoreszenz war jedoch deutlich von der grünlichen des FITC unterscheidbar.

Abb. 14: Adrenerge Nerven in der rechten Kammer eines menschlichen Herzens. Deutlich erkennbar sind zwei die Muskelfasern überquerende Nervenfasern. Aufgrund des langen Intervalls postmortal (23 h) ist die spezifische Fluoreszenz schon leicht diffundiert.

3.5.4.2. Phäochromocytom

Die spezifische Fluoreszenz zeigte sich in feinkörnigen Niederschlägen, die besonders deutlich in Membrannähe erkennbar ist.

Bemerkenswert ist, daß auch nach wochenlanger Lagerung bei einer Temperatur von -18 °C eine Darstellung gelang.

3.5.5. Autofluoreszenz

Während Erythrocyten eine rötliche Eigenfluoreszenz besaßen, zeigten elastische und kollagene Bindegewebsfasern und Lipofuszingranula bei der verwandten Filterkombination eine gelbe Autofluoreszenz.

Diese unspezifische Färbung kontrastierte jedoch gut mit den grünlich fluoreszendierenden DBH-positiven Nervenfasern.

3.6. PAP-Methode

3.6.1. Spezifitätskontrolle der Antisera

Abb. 15: Antikörperbildung gegen Kaninchenserum. Die breite Präzipitatbande liegt nahe der mit anti-Kaninchen=serum-IgG gefüllten Vertiefung.

Abb. 16: Antikörperbildung gegen PAP-Komplex. Es ist eine einzige, in der Mitte zwischen Antigen und Antikörper gelegene Linie erkennbar.

3.6.2. Vorversuch

3.6.2.1. Plasmocytom

Das Plasmocytom zeigte eine monoklonale Vermehrung von IgG. Die histologische Struktur war nach Fixierung in Formalin gut erhalten. Ein hoher Prozentsatz der Tumorzellen reagierte mit Kaninchenserum gegen menschliches Immunglobulin G, deutlich erkennbar an roten Carbazol-Niederschlägen in den Zellen.

3.6.2.2. Magenfrühcarcinom

Von mit Antikörpern gegen IgG, IgM, IgA und gegen leichte Ketten inkubierten Schnitten reagierten die nach IgA-Überschichtung positiv. In den Plasmazellen, die α -Ketten enthielten, lagerte sich rotes Carbazol ab.

Keine oder nur vereinzelt positive Reaktionen ergaben Überschichtungen dieses Tumors mit Seren gegen IgG und IgM.

3.6.3. Kryostatschnitte

Unfixierte Kryostatschnitte zeigten die stärkste Immunantwort. Die Gewebsstrukturen waren jedoch nicht so gut erhalten wie in den Paraffinschnitten.

Das Reaktionsprodukt war rot (Carbazol) oder braun (Diamino=benzidin) und gut erkennbar. Auch nach einem Jahr war noch keine Verfärbung oder Auskristallisation zu beobachten.

In Herzgeweben bildeten sich feine, scharf abgegrenzte Netzstrukturen, die besonders peripher eine starke Anfärbung zeigten.

Im NNM zeigten sich dichte Ballen chromaffiner Zellen. Das Reaktionsprodukt fand sich streng intrazellulär lokali=siert ohne randständige Diffusionserscheinungen.

Kontrollschnitte, die ohne Primärantikörper inkubiert waren, zeigten keine spezifische Immunreaktivität.

3.6.3.1. Meerschweinchen

3.6.3.1.1. Herz

Es konnten die Herznerven in typischer Verteilung dargestellt werden, wobei die Anfärbung jedoch schwächer als bei der fluoreszenzmikroskopischen Methode war.

3.6.1.2. NNM

Nahe der Zellmembran chromaffiner Zellen fanden sich fein=körnige rote Carbazolablagerungen, wohingegen die Kerne DBH-negativ waren. Insgesamt färbten sich die Randzonen des Marks stärker an als die Rinde.

Die NNR blieb von dieser Anfärbung ausgespart.

3.6.3.2. Ratte

3.6.3.2.1. Herz

Die Herznerven waren darstellbar, die Reaktion jedoch

schwächer als im Meerschweinchenherzen.

3.6.2.2. NNM

Auch hier zeigte sich im Mark eine unterschiedliche Intensität der Anfärbung, wobei die Peripherie weitaus stärker angefärbt war.

3.6.3.3. Rind

3.6.3.3.1. Herz

Es war eine sehr gute Darstellung der adrenergen Strukturen möglich.

Die DBH-enthaltenden Neurone erschienen in dunklem Carbazolrot, das sich gut gegen den hellroten Hintergrund abhob. Besonders deutlich im Bereich der Herzohren und der Vorhöfe waren feinverzweigte Netzstrukturen erkennbar.

Abb. 17: Adrenerge Nerven im rechten Herzohr des Ochsenherzens. Einige der feinen Nervenfasern verlaufen

parallel zu den Muskelfasern; andere - insbesondere die sich verzweigenden-- überqueren die Muskelfasern. Die Terminalfasern bilden Varikositäten aus, die an roten punktförmigen Carbazolniederschlägen erkennbar sind.

3.6.3.4. Mensch

3.6.3.4.1. Herz

Auch hier gelang eine gute Darstellung bis zu 50 Stunden postmortal. Verlängerte sich dieser Zeitraum jedoch, so war die Autolyse zu stark fortgeschritten, und das Gewebe zeigte lediglich eine diffuse unspezifische Hintergrundsfärbung.

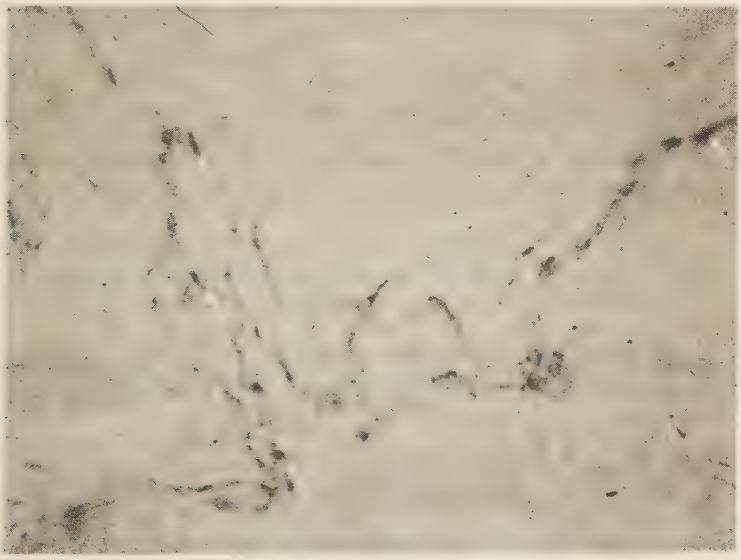

Abb. 18: Adrenerge Nerven im rechten Herzohr eines Menschenherzens. Von drei Seiten laufen die Fasern zusammen, verzweigen sich und bilden einen dichten, zusammenhängenden Plexus. Vereinzelt sind Varicositäten erkennbar.

3.6.3.4.2. NNM

Es konnten chromaffine Zellen im Zentrum des NNM dargestellt werden mit scharfer Grenze zur ungefärbten Rinde.

3.6.4. Paraffinschnitte

Wurde das Gewebe nach MAUNSBACH (1966) fixiert, war die histologische Struktur auch nach einem Jahr noch gut erhalten. Die Immunantwort war jedoch in vielen Schnitten fraglich negativ, insbesondere in sehr gut fixierten Ge= weben.

Eine Verbesserung konnte durch BOUIN-Fixierung erzielt werden. Hier stellten sich in den meisten der untersuchten Gewebe (Ratte, Meerschweinchen, Mensch) adrenerge Strukturen dar.

3.6.5. Pronasetechnik

Die Andauung mit Pronase verbesserte die Immunreaktivität der Gewebe deutlich.

In vielen nach MAUNSBACH (1966) fixierten Geweben, in denen eine Anfärbung zunächst ganz ausgeblieben war, führte die Pronasetechnik zu einer befriedigenden Darstellung.

In zunächst nur schwach gefärbten Schnitten war nach An= dauung mit Pronase das Reaktionsprodukt dichter gefärbt und besser abgrenzbar.

3.6.6. Blockade der endogenen Peroxidase

Die H_2O_2-Methanol-Methode führte zu einer totalen Blockade der endogenen Peroxidase in den Erythrozyten und reduzierte die unspezifische Hintergrundsfärbung merklich.

Es bestand jedoch die Gefahr, daß auch die Peroxidaseakti= vität des PAP-Komplexes blockiert wurde. So blieb teil=

weise ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit die Anfärbung gänzlich aus.

3.6.7. Konzentrationen

Die Anfärbungen gelangen am besten, wenn folgende Verdünnungen gewählt wurden:

Kaninchenserum	1 : 40
Schweineserum	1 : 20
anti-Kaninchenserum-IgG	1 : 10
PAP-Komplex	1 : 100

Wurde das Kaninchenserum höher verdünnt, war die Immunreaktivität merklich schwächer. Die unspezifische Hintergrundsfärbung erschien bei diesen höheren Verdünnungen nicht vermindert.

4. Diskussion

4.1. Antigen

4.1.1. DBH

Die Markierung von DBH scheint catecholaminhistochemischen Verfahren überlegen zu sein.

Insbesondere in Geweben, deren Transmittergehalt im Vergleich zur Umsatzrate niedrig ist, gelingt eine gute Darstellung mittels DBH (HARTMAN, 1973). Dabei ist die DBH-Methode, die ausschließlich noradrenerge Strukturen markiert, von höherer Spezifität: Mittels FALCK-Methode (FALCK et al., 1962) werden auch dopaminerge, adrenerge und serotinerge Gebilde angefärbt.

Es ist einfacher, ein Makromolekül zu lokalisieren, als eine leicht diffusible, niedermolekulare Substanz. DBH besitzt eine relative antigene Stabilität und diffundiert kaum fort: Aufgrund seiner Molekülgröße und der festen Bindung an die Vesikelmembran ist das Enzym relativ ortsbeständig.

4.1.1.1. Herz

DBH ist eine spezifische Markersubstanz für noradrenalin=haltige Neurone.

Frühere Untersuchungen (Lit. s. Borchard, 1978) hatten ergeben, daß der dominierende Transmitter im Herzen des Menschen und der Ratte das Noradrenalin ist, so daß sich die DBH-Methode zur Darstellung adrenerger Herznerven hervorragend eignet.

So konnte HARTMAN bereits 1973 mittels DBH-Immunfluoreszenz das noradrenerge Innervationsmuster des Rattenherzens sichtbar machen. MORRISON et al. (1978) stellten mit der gleichen Methode und GRZANNA et al. (1978) mittels PAP-Methode noradrenerge Fasern im Neocortex der Ratte dar.

4.1.1.2. NNM

DBH wird in den chromaffinen Granula des NNM gespeichert (KIRSHNER, 1959; OKA et al., 1967). Die Enzymaktivität erstreckt sich auf die löslichen Chromogranine (BLASCHKO et al., 1967) und auf die unlöslichen Membranproteine.

Diese Lokalisation macht DBH zu einer geeigneten Markersubstanz für die chromaffinen Granula des NNM. In zahlreichen Studien an unterschiedlichen Spezies gelang bereits eine selektive Darstellung des Marks ohne Verfärbung der Rinde (HARTMAN und UDENFRIEND, 1969; NAGATSU, 1974; VERHOFSTAD et al., 1979).

4.1.2. Chromaffine Granula

4.1.2.1. Phäochromocytom

Chromaffine Granula enthalten neben DBH weitere Proteine (z. B. Chromogranin A), Catecholamine und Lipide (LAGERCRANTZ, 1971).

Die herabgesetzte Reinheit des Antigens scheint jedoch die Darstellung nur unwesentlich zu beeinflussen.

Nach Untersuchungen von GEFFEN et al. (1969) an Schafsgeweben ist Chromogranin A identisch mit DBH verteilt. HARTMAN (1973) stellte übereinstimmende morphologische Befunde in DBH-und catecholaminfluoreszenzmikroskopischen Darstellungen fest. Somit verändern Chromogranin A und Catecholamine die Befunde nicht.

Zur Zeit liegen noch keine Studien darüber vor, inwieweit die anderen Bestandteile die unspezifische Hintergrundsfärbung erhöhen. In unseren Geweben konnten wir keine wesentliche Erhöhung gegenüber der DBH-Methode beobachten. Die Verteilungsmuster der adrenergen Strukturen stimmten in beiden Methoden überein.

Es ist somit anzunehmen, daß die Reinheit des Antigens ausreichend ist.

4.1.2.2. Sympathicusganglion

Die Vesikel eines sympathischen Nervenstamms unterscheiden sich von den chromaffinen Granula des NNM nur quantitativ (LAGERCRANTZ, 1971).

So liegt beispielsweise die DBH-Aktivität im Nervenstamm (1.14 units/mg Protein) niedriger als im NNM (2.01 units/ mg Protein).

Die antigenen Strukturen von Vesikeln eines Sympathicus= ganglions sind jedoch weitgehend mit denen chromaffiner Granula identisch, so daß die immunhistochemischen Darstellungen bei den verschiedenen Primärseren keine Unterschiede zeigen.

4.2. Primärantikörper

4.2.1. Spezifität

FRYDMAN und GEFFEN (1973) verwandten für die Darstellung eines Lammnebennierenmarks chromatografisch nicht gereinigte Primärantikörper. In ihren Abbildungen sind einige dicht gefärbte Bereiche im Interstitium des Marks und sogar in der Rinde zu beobachten, die nach Ansicht von NAGATSU (1974) auf Unreinheiten des Primärantikörpers beruhen.

In anderen Arbeiten, in denen lediglich durch Ammonium= sulfat gefälltes Immunglobulin (HARTMAN und UDENFRIEND, 1969) oder rohes Antiserum verwandt wurde (KÖNIG, 1979), gelang hingegen eine zufriedenstellende Darstellung.

Wir möchten annehmen, daß die Spezifität des rohen Anti= serums ausreichend ist, wie es auch nach unseren Ergebnissen zu erwarten ist.

4.2.2. Kreuzantigenität

GIBB et al. (1967) stellten als erste spezifische Antikörper

gegen DBH her. Sie isolierten das Enzym aus einem mensch=lichen Phäochromocytom und aus dem NNM von Hund und Meer=schweinchen und wiesen bei allen drei Spezies eine Kreuz=reaktivität mit boviner DBH nach.

Es folgten zahlreiche Arbeiten, in denen dieses Ergebnis auch an anderen Arten bestätigt werden konnte. So wurde eine Kreuzreaktivität zwischen Rinder-DBH einerseits und DBH der Ratte (HARTMAN und UDENFRIEND, 1969; HARTMAN, 1973; VERHOFSTAD et al., 1979) , des Meerschweinchens (KÖNIG, 1979) und der Kröte (NAGATSU et al., 1979) anderer=seits beschrieben. Ferner wiesen FUXE et al. (1970) eine Kreuzantigenität zwischen Kaninchen- und Ratten-DBH nach.

Auch die Befunde unserer Untersuchungen bestätigten eine Kreuzantigenität zwischen Rinder- und menschlicher DBH:

4.2.2.1. OUCHTERLONY-Tests

Alle Kaninchensera zeigten eine Immunreaktivität sowohl mit Rinder-DBH als auch mit menschlichen Geweben. Diese Immunreaktivität war unabhängig von der Art der Immuni=sierung.

Ein gegen Rinder-DBH gezüchtetes Serum bildete nicht nur mit boviner DBH Präzipitatbanden, sondern auch mit Homo=genaten von Phäochromocytomen, Sympathicusganglien und chromaffinen Granula. Umgekehrt reagierte ein gegen mensch=liches Gewebe gezüchtetes Serum mit boviner DBH, deutlich erkennbar an einer einzigen schmalen Präzipitatbande.

Eine solche Immunreaktivität fehlte dagegen in den Seren nichtsensibilisierter Kaninchen, so daß ein natürliches Vorkommen der Antikörper nicht anzunehmen ist.

4.2.2.2. Immunhistochemische Befunde

4.2.2.2.1. Herz

In den Herzabschnitten aller untersuchten Spezies ließen

sich die Herznerven in typischer Verteilung darstellen. Das Innervationsmuster wich nicht wesentlich von früheren Darstellungen mittels FALCK-Methode (vergl. BORCHARD, 1978) und DBH-Immunfluoreszenz (HARTMAN, 1973) ab.

4.2.2.2.2. NNM

Über die selektive Darstellung des NNM verschiedener Spezies mittels indirekter Immunfluoreszenz sind mehrere Veröffentlichungen bekannt.

So konnte das NNM des Meerschweinchens (NAGATSU et al., 1977), der Ratte (HARTMAN, 1973; HARTMAN und UDENFRIEND, 1970; VERHOFSTAD et al., 1979) und des Rinds (HARTMAN und UDENFRIEND, 1970; NAGATSU, 1974) dargestellt werden.

Als Antigen, gegen das das Primärserum gezüchtet wurde, diente DBH.

Für seine Studien an Rind und Meerschweinchen isolierte NAGATSU (NAGATSU, 1974; NAGATSU et al., 1977) das Enzym aus einem menschlichen Phäochromocytom, in den übrigen Fällen erfolgte die Herstellung aus bovinem Nebennierenmarksgewebe.

Bei allen Autoren gelang für die untersuchten Spezies eine selektive Darstellung des Marks mit scharfer Grenze zur ungefärbten Rinde, wobei die spezifischen Immunfluoreszenz keine wesentlichen Unterschiede aufwies.

Ferner gelang es NAGATSU (NAGATSU, 1974; NAGATSU et al., 1979), das NNM von Rind, Kröte und Ratte mit der PAP-Methode darzustellen. Als Antigen wurde bovine DBH verwandt. Die Ergebnisse stimmten mit den immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellungen überein.

Diese Veröffentlichungen zeigen, daß eine Kreuzreaktivität zwischen Immunseren, die gegen DBH unterschiedlicher Spezies gerichtet sind, besteht.

Unsere morpohologischen Befunde vom NNM des Menschen, des Meerschweinchens und der Ratte und eines menschlichen Phäochromocytoms stimmten mit diesen Darstellungen überein, so daß eine Kreuzantigenität zwischen boviner DBH und DBH des Menschen, des Meerschweinchens und der Ratte bestätigt wurde. Über die Höhe der Reaktivität des Primärserums sagen diese Untersuchungen freilich nichts aus. In Anbetracht des hohen Enzymgehalts adrenerger Strukturen ist jedoch selbst ein Antikörper niedriger Kreuzreagibilität für ihre Markierung ausreichend (VERHOFSTAD et al., 1979).

4.3. Immunreaktivität der Gewebe mit verschiedenen Kaninchenseren

War der Primärantikörper gegen Rinder-DBH gezüchtet worden, zeigte bovines Gewebe die stärkste Anfärbbarkeit. Wurden als Antigen chromaffine Granula verwandt, war die Immunreaktivität in menschlichen adrenergen Geweben am stärksten.

Obwohl die Kreuzantigenität der DBH für die Anfärbung heterologer Gewebe ausreichend ist, scheint nach diesen Befunden eine bessere Darstellung mittels artgleicher DBH zu gelingen.

Bemerkenswert ist ferner die unabhängig von der Art des Antigens bestehende relativ schwache Reaktion der Ratte gegenüber der guten Darstellbarkeit beim Menschen, Meerschweinchen und Rind.

4.4. Allgemeine morphologische Befunde

4.4.1. Herz

Während sich die adrenergen Fasern in den Vorhöfen netzartig verzweigen, verlaufen sie in den Kammern eher parallel. Die Innervationsdichte nimmt über Vorhöfe, rechte Kammer

bis zur linken Kammer ab.

Dieses in unseren Untersuchungen gefundene Muster der sympathischen Innervation ist bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben, in denen die Herznerven mittels FALCK-Methode dargestellt wurden (ANGELAKOS et al., 1963; BORCHARD, 1978).

In Übereinstimmung mit HARTMAN (1973), der adrenerge Nerven eines Rattenherzens mittels DBH-Immunfluoreszenz darstellte, konnten wir keine wesentlichen Unterschiede gegenüber der catecholaminhistochemischen Methode finden. Lediglich die Darstellung der von BORCHARD (1978) beschriebenen dopaminergen Zellen im Bereich des hinteren Vorhofseptums wäre mit unserer Methode nicht möglich. Die Nichtanfärbbarkeit dopaminerger Neurone mittels DBH-Methode beinhaltet jedoch den Vorteil einer höheren Spezifität.

4.4.2. NNM

Die chromaffinen Zellen des NNM enthalten entweder nur Tyrosinhydroxylase, Dopadecarboxylase und Dopamin-ß-Hydroxylase und produzieren Noradrenalin, oder sie enthalten zusätzlich Phenyläthanolamin-N-methyltransferase und bilden Adrenalin (VERHOFSTAD et al., 1979). Beide Zellgruppen sind DBH-positiv.

Wie NAGATSU et al. (1979) elektronenmikroskopisch feststellen konnten, findet sich DBH fast ausschließlich in den Granula des Cytoplasmas, wohingegen die Grundsubstanz DBH-negativ ist.

Die Verteilung der spezifischen Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz (HARTMAN und UDENFRIEND, 1970; NAGATSU, 1974; NAGATSU et al., 1977; VERHOFSTAD et al., 1979) ist nahezu identisch mit den morphologischen Befunden der PAP-Methode (NAGATSU, 1974; NAGATSU et al., 1979).

Die PAP-Methode scheint jedoch aufgrund einiger Vorteile überlegen zu sein.

4.5. PAP- und FITC-Methode

Wie CURRAN und GREGORY (1978) feststellten, sind FITC- und PAP-Methode gleichermaßen geeignet, Antigen in Kryostat- und Paraffinschnitten zu lokalisieren. Das Reaktionsprodukt ist jedoch in PAP-Schnitten dichter angefärbt und besser abgegrenzt.

Die Verteilung des Antigens ist in beiden Techniken identisch. Somit haben die unterschiedlichen Molekulargewichte des FITC und der Peroxidase keine Bedeutung. Diese Ergebnisse stimmen mit verschiedenen Veröffentlichungen überein (BURNS et al., 1974; CURRAN und GREGORY, 1978; PICH et al., 1976; VLADUTIU et al., 1973).

Die FITC-Methode ist weniger zeitaufwendig und als Screening-Methode geeignet. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung wie bei PAP-Schnitten ist jedoch nicht möglich.

Ein weiterer Nachteil ist die geringe Haltbarkeit der Kryostatschnitte, die einen Vergleich mit späteren Präparaten ausschließt. Demgegenüber konnten wir wie GRAHAM et al. (1965) in PAP-Schnitten keine Verfärbung des Reaktionspro=duktes feststellen.

Nach Schätzungen von STERNBERGER (1979) ist die PAP-Methode 100 - 1000 mal sensibler als die Immunfluoreszenz. Der Grund für diese hohe Sensibilität ist unbekannt. Vermutlich ist sie auf die erhöhte Anzahl antigener Bindungsstellen, die mit dem Brückenantikörper reagieren, zurückzuführen (HUANG, 1975).

Durch Paraffineinbettung wird zwar ein Teil der antigenen Determinanten zerstört, doch ist aufgrund der hohen Sensibilität der PAP-Methode eine gute Darstellung meistens möglich.

Eine Kristallisation der Farbstoffe während der Inkubation wurde nicht beobachtet (GRAHAM et al., 1965).

4.6. Darstellbarkeit postmortal

Nach dem Tode sinken die Catecholaminkonzentrationen im menschlichen Herzen kontinuierlich bis auf kaum meßbare Werte ab.

BORCHARD (1978) stellte fest, daß die Catecholaminwerte innerhalb der ersten 24 Stunden postmortal um 70 % abfallen und nach der 40. Stunde kaum noch meßbar sind. Nach ELBADAWI (1970) beträgt der Schwund der Catecholaminkonzentration in den ersten Stunden 30 %.

Bei Anwendung der FALCK-Methode ist bereits drei Stunden postmortal eine Diffusion der Catecholamine zu beobachten. Nach acht Stunden ist die Fluoreszenz völlig diffus und eine Darstellung adrenerger Strukturen nicht mehr möglich BORCHARD, 1978).

In unseren fluoreszenzmikroskopischen Studien gelang es, DBH 23 Stunden nach dem Tode zu lokalisieren. Mittels PAP-Methode konnten adrenerge Strukturen sogar bis zu 50 Stunden postmortal dargestellt werden.

Es ist anzunehmen, daß die Catecholamine, die nach dem Tode nicht mehr in den granulierten Vesikeln gehalten werden können, sofort durch die Enzyme Monoaminooxidase und Catechol-O-methyltransferase gespalten werden (BORCHARD, 1978). Demgegenüber scheint die Inaktivierung der DBH weitaus langsamer zu erfolgen. Nach HÖRTNAGEL et al. (1972) ist die membrangebundene DBH vermutlich ein fester Bestandteil der Membran und nicht ein absorbiertes lösliches Enzym. Diese feste Bindung innerhalb der Membranstruktur verhindert möglicherweise eine schnelle Diffusion nach dem Tode.

4.7. PAP-Methode

4.7.1. Reaktivität der Antisera

Die Reaktivität des Brückenantikörpers und des PAP-Komplexes

konnte kürzlich nachgewiesen werden (BURNS, 1975; TAYLOR und BURNS, 1974). Unsere OUCHTERLONY-Tests, in denen sich eine Immunreaktivität des Schweine-IgG mit Kaninchenserum und des PAP-Komplexes mit Schweine-IgG zeigte, konnten diese Ergebnisse bestätigen.

4.7.2. Vorversuch

Die deutlich sichtbaren positiven Immunreaktionen der Tumorzellen mit anti-IgG (Plasmocytom) und anti-IgA (Magencarcinom) zeigten, daß die PAP-Färbung methodisch einwandfrei war.

4.7.3. Kryostat- und Paraffinschnitte

Unabhängig voneinander entdeckten DI STEFANO et al. (1973), HALMI et al. (1975) und TAYLOR und BURNS (1974), daß die PAP-Methode auch an Paraffinschnitten durchführbar ist. Noch nach Jahrzehnten ist eine Untersuchung dieser Paraffinschnitte möglich.

Paraffinblöcke können leichter gelagert werden; es können größere Schnitte angefertigt werden, so daß umfangreichere Gewebsstücke untersucht werden können. Zudem bleiben die zellulären Grenzen der Präparate besser erhalten.

Wie auch andere Untersucher feststellten (CURRAN und GREGORY, 1978; HUANG, 1975), scheint die Immunreaktivität in Paraffinschnitten schwächer zu sein.

So färbten sich Kryostatschnitte in immunhistochemischen Studien von HUANG (1975) über Hepatitis-B-Antigene intensiv an, wohingegen die Reaktion in Paraffinschnitten schwächer war.

Auch in unseren Untersuchungen zeigten unfixierte Kryostatschnitte die stärkste Immunreaktivität. Möglicherweise enthält unser Primärserum nur eine verhältnismäßig gerine

Anzahl spezifischer Antikörper. Die Paraffineinbettung zerstört einen Teil der diese Antikörper bindenden antigenen Determinanten und verringert zusätzlich die Zahl spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe. In einigen Schnitten schien diese geringe Anzahl für eine gute Anfärbbarkeit nicht mehr ausreichend zu sein. Die Darstellbarkeit war jedoch auch von anderen technischen Bedingungen abhängig.

4.7.4. Fixiermittel

Wurde das Gewebe nach MAUNSBACH (1966) fixiert, war die Immunreaktivität in vielen Schnitten fraglich negativ.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Untersuchungen. Auch CURRAN und GREGORY (1978) stellten fest, daß die Reaktivität ihrer nach MAUNSBACH fixierten Gewebe unvorhersagbar und oft scheinbar negativ war. Insbesondere in Geweben mit sehr gut erhaltenen histologischen Strukturen blieb die spezifische Anfärbung aus.

Eine deutliche Verbesserung konnten wir durch BOUIN-Fixierung erzielen. Hier stellten sich in den meisten untersuchten Geweben adrenerge Strukturen dar. Offenbar schützt die BOUINsche Lösung antigene Determinanten besser.

4.7.5. Pronasetechnik

Um die membrangebundene DBH für den Antikörper leichter zugänglich zu machen, ist nach GRZANNA et al. (1978) der Gebrauch von Triton-x-100 empfehlenswert, eines Detergens, das die antigenen Bindungsstellen der DBH freilegen soll.

Eine andere Möglichkeit ist die Vorbehandlung mit Enzymen,.

So stellten sich in vielen unserer nach MAUNSBACH (1966) fixierten Gewebe, in denen eine Anfärbung zunächst ganz ausgeblieben war, nach Pronasetechnik adrenerge Strukturen

dar. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Ver=öffentlichungen:

Mit einer modifizierten Pronasetechnik konnten DENK et al. (1977) in menschlichen Nieren und Lymphknoten Immunglobu=line nachweisen. DIENES et al. (1978) stellten fest, daß formalinfixierte Immunglobuline nach Pronase wieder antigen wirksam werden. CURRAN und GREGORY (1978) konnten nach Trypsinandauung sogar niedrige Antigenkonzentrationen in Schnitten entdecken, die zuvor keine Reaktion ergeben hatten. Daraus folgerten sie, daß ein Fixiermittel antigene Struk=turen nicht zerstört (STERNBERGER, 1979), sondern das Antigen nur für das große Antikörpermolekül unerreichbar abdeckt. Die Andauung erhöht die Permeabilität der Gewebe, so daß die Antikörper sich mit den Determinanten verbinden. Für diese Theorie spricht, daß die Reaktivität zunimmt, wenn die Andauungszeit verlängert wird.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß das Enzym mit dem Antigen reagiert und kreuzreagierende Moleküle freisetzt.

Wie auch frühere Untersucher feststellen konnten (HUANG, 1975), führte die Andauung mit Pronase zusätzlich zu einer deutlichen Verminderung der unspezifischen Hintergrunds=färbung.

4.7.6. Blockade der endogenen Peroxidase

Die H_2O_2-Methanol-Methode zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurde 1971 von STRAUS eingeführt. Sie führt zu einer totalen Blockade der Erythrozytenperoxidase und reduziert die unspezifische Hintergrundsfärbung merklich. Daher wurde sie von zahlreichen Autoren angewandt, so von BURNS (1975), CURRAN und GREGORY (1978) und DE LELLIS et al. (1979). Alle beobachteten eine Reduktion der unspezifischen Hintergrunds=färbung.

So stellten CURRAN und GREGORY fest, daß die endogene

Peroxidase in Erythrozyten und Leukozyten vollständig gehemmt wurde, ohne daß die immunhistochemische Reaktion der Gewebe beeinträchtigt war. Ihrer Ansicht nach verstärkte die fixierende Wirkung des H_2O_2-Methanols sogar die Immunreaktivität.

Auch in unseren Untersuchungen verminderte sich die unspezifische Hintergrundsfärbung nach H_2O_2-Methanol-Methode. In einigen Schnitten blieb jedoch gleichzeitig die spezifische Anfärbung aus. Möglicherweise war bei diesen Färbungen zusätzlich die Peroxidaseaktivität des PAP-Komplexes gehemmt worden. Ungeklärt bleibt, warum die Anfärbung nur in einigen Schnitten ausblieb.

4.7.7. Konzentrationen

Nach STERNBERGER (1979) muß das Primärserum niedrig konzentriert sein, damit sich die unspezifische Hintergrundsfärbung vermindert. Er schlägt ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 1000 vor; wenn das Antiserum nur eine geringe Anzahl unspezifischer Antikörper enthält, auch 1 : 100. Folgende Überlegungen liegen diesem Vorschlag zugrunde:

Normalerweise beinhaltet das Primärserum zum größten Teil spezifische und nur eine geringe Anzahl unspezifische Antikörper. Ist das Serum hoch verdünnt, reicht die Konzentration der spezifischen Antikörper noch für eine Reaktion mit dem PAP-Komplex aus, wohingegen die unspezifischen Antikörper zu hoch verdünnt sind.

Auch in Blocktitrationsstudien von BURNS (1975), in denen das Primärserum im Verhältnis 1 : 10 bis 1 : 5120 verdünnt wurde, war die unspezifische Hintergrundsfärbung in hohen Verdünnungen (1 : 2560 und 1 : 5120) praktisch nicht mehr feststellbar.

Nach diesen Ergebnissen ist es überraschend, daß unsere Anfärbungen am besten mit dem niedrigsten Verdünnungsverhältnis, nämlich 1 : 40, gelangen. Vermutlich enthält unser Primärserum nur eine geringe Anzahl spezifischer Antikörper, die in hohen Verdünnungsverhältnissen für eine gute Darstellung nicht mehr ausreicht.

5. Zusammenfassung

Zwei immunhistochemische Methoden, die FITC- und die PAP-Technik, wurden zur Darstellung adrenerger Strukturen in postmortalen Geweben angewandt.

Untersucht wurden Herz und Nebennierenmark von Wistarratten, Meerschweinchen und Menschen, zwei Rinderherzen und ein menschliches Phäochromocytom.

Das Verteilungsmuster der adrenergen Strukturen war in allen Spezies identisch. Die Immunreaktivität der Gewebe hing jedoch von der Art des Antigens ab, gegen das das Primär-serum gerichtet war, und war bei homologem Antigen am stärksten.

Wie unsere Untersuchungen an der PAP-Technik ergaben, wird die Anfärbbarkeit der Gewebe außerdem durch folgende Bedingungen beeinflußt:

1. Art des Schnittes

Unfixierte Kryostatschnitte zeigten die stärkste Immun-reaktivität.

2. Fixiermittel

Wurde das Gewebe nach MAUNSBACH (1966) fixiert, war die Immunantwort in vielen Schnitten fraglich negativ, wohin-gegen sich mit BOUIN-Fixierung in den meisten untersuchten Geweben adrenerge Strukturen darstellten.

3. Pronasetechnik

Die Andauung mit Pronase verstärkte die Immunreaktivität der Gewebe.

4. H_2O_2-Methanol-Methode

Die H_2O_2-Methanol-Methode führte zu einer totalen Blockade der endogenen Peroxidase in den Erythrocyten und reduzierte

die unspezifische Hintergrundsfärbung merklich. In einigen Schnitten wurde jedoch gleichzeitig die Peroxidaseaktivität des PAP-Komplexes blockiert, so daß jegliche Anfärbung ausblieb.

5. Konzentrationen

Die Anfärbungen gelangen am besten, wenn folgende Verdünnungen gewählt wurden:

Kaninchenserum	1 : 40
Schweineserum	1 : 20
anti-Kaninchenserum-IgG	1 : 10
PAP-Komplex	1 : 100

FITC- und PAP-Methode waren gleichermaßen geeignet, Antigen in Kryostat- und Paraffinschnitten zu lokalisieren. Das Reaktionsprodukt war jedoch in PAP-Schnitten dichter angefärbt und besser abgrenzbar.

In den fluoreszenzmikroskopischen Studien gelang es, DBH 23 Stunden postmortal zu lokalisieren. Mit der PAP-Methode konnten adrenerge Strukturen sogar bis zu 50 Stunden postmortal dargestellt werden.

6. Literaturverzeichnis

ANGELAKOS, E. T.; FUXE, K.; TORCHIANA, M. L.:

Chemical and histochemical evaluation of the distribution of catecholamines in the rabbit and guinea pig hearts.

Acta Physiol. Scand. 59, 184-192 (1963)

AVRAMEAS, S.:

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies.

Immunochemistry 6, 43-52 (1969)

AVRAMEAS, S.:

Indirect immunoenzyme techniques for the intracellular detection of antigens.

Immunochemistry 6, 825-831 (1969)

BELPAIRE, F.; LADURON, P.:

Tissue fractionation and catecholamines. I. Latency and activation properties of dopamine ß-hydroxylsae in adrenal medulla.

Biochem. Pharmacol. 17, 411-421 (1968)

BIGBEE, J. W.; KOSEK, J. C.; ENG, L. F.:

Effects of primary antiserum dilution on staining of "antigen-rich" tissues with the peroxidase-antiperoxidase technique.

J. Histochem. Cytochem. 25, 443-447 (1977)

BLASCHKO, H.:

Catecholamines.

In: Catecholamines. Handbook of experimental pharmacology; vol. XXXIII.
Eds. H. BLASCHKO and E. MUSCHOLL. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1972. p. 1-15

BLASCHKO, H.; COMLINE, R. S.; SCHNEIDER, F. H.; SILVER, M.; SMITH, A. D.:

Secretion of a chromaffin granule protein chromogranin from the adrenal gland after splanchnich stimulation.

Nature(London) 215, 58-59 (1967)

BORCHARD, F.:

The adrenergic nerves of the normal and the hypertrophies heart: biochemical, histochemical, electron-microscopic and morphometric studies.

In: Normale und pathologische Anatomie; Bd. 33. Hrsg. W. BARGMANN und W. DOERR. Stuttgart: Thieme, 1978. p. 1-68

BURNS, J.:

Short communication. Background staining and sensivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material.

Histochemistry 43, 291-294 (1975)

BURNS, J.; HAMBRIDGE, M.; TAYLOR, C. R.:

Intracellular immunoglobulins: a comparative study on three standard tissue processing methods unsing horseradish peroxidase and fluorochrome conjugates.

J. Clin. Pathol. 27, 548-557 (1974)

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N.; BERLINER, E.:

The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.

J. Immunol. 45, 159-170 (1942)

CREECH, H. J.; JONES, R. N.:

The conjugation of horse serum albumin with 1,2-benzanthryl isocyanates.

J. Amer. Chem. Soc. 62, 1970-1975 (1940)

CURRAN, R. C.; GREGORY, J.:

The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin.

Experientia 33, 1400-1401 (1977)

CURRAN, R. C.; GREGORY, J.:

Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques.

J. Clin. Pathol. 31, 974-983 (1978)

CURRAN, R. C.; JONES, E. L.:

Immunoglobulin-containing cells in human tonsils as demonstrated by immunohistochemistry.

Clin. Exp. Immunol. 28, 103-115 (1977)

DE ARMOND, S. J.; ENG, L. F.; RUBINSTEIN, L. J.:

The application of glial fibrillary acidic (GFA) protein immunohistochemistry in neurooncology.

Pathol. Res. Pract. 168, 374-394 (1980)

DE BOLD, A. J.; BENCOSME, S. A.:

Studies on the relationship between the catecholamine distribution in the atrium and the specific granules present in atrial muscle cells. 1. Isolation of the purified specific granule subfraction.

Cardiovasc. Res. 7, 351-363 (1973) a

DE BOLD, A. J.; BENCOSME, S. A.:

Studies on the relationship between the catecholamine distribution in the atrium and the specific granules present in atrial muscle cells. 2. Studies on the sedimentation pattern of atrial noradrenaline and adrenaline.

Cardiovasc. Res. 7, 364-369 (1973) b

DE LELLIS, R. A.; STERNBERGER, L. A.; MANN, R. B.; BANKS, P. M.; NAKANE, P. K.:

Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology.

Am. J. Clin. Pathol. 71, 483-488 (1979)

DENK, H.; RADASZKIEWICZ, T.; WEIRICH, E.:

Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) technique.

J. Immunol. Methods 15, 163-167 (1977)

DIENES, H. P.; STERZL, R. B.; DRÖSUS, J. U.; KRAUSE, P. H.:

Immunhistologischer Nachweis von Serumproteinen in formalinfixiertem und nativem Gewebe- Vergleichende Untersuchungen bei experimentellen Glomerulonephritiden der Ratte.

Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 62, 519 (1978)

DI STEFANO, H. S.; MARUCCI, A. A.; DOUGHERTY, R. M.:
Immunohistochemical demonstration of avian leukosis virus antigens in paraffin embedded tissus.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 142, 1111-1113 (1973)

EHINGER, B.; FALCK, B.; SPORRONG, B.:
Adrenergic fibres to the heart and to peripheral vessels.
Bibl. Anat. 8, 35-45 (1966)

ELBADAWI, A.; HAYASHI, K. D.; SCHENK, E. A.:
Histochemical demonstration of norepinephrine in postmortem tissues.
Histochemie 21, 21-26 (1970)

FALCK, B.; HILLARP, G.; THIEME, G.; THORP, A.:
Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde.
J. Histochem. Cytochem. 10, 348-354 (1962)

FOLDES, A.; JEFFREY, P. L.; PRESTON, B. N.; AUSTIN, L.:
Dopamine ß-hydroxylase of bovine adrenal medullae. A rapid purification procedure.
Biochem. J. 126, 1209-1217 (1972)

FRIEDMAN, S.; KAUFMAN, S.:
3,4-Dihydroxyphenylethylamine ß-hydroxylase: a copper protein.
J. Biol. Chem. 240, 552-554 (1965)

FRYDMAN, R.; GEFFEN, L. B.:
Depletion and repletion of adrenal dopamine ß-hydroxylase after reserpine. Immunohistochemical and fine structural correlates.
J. Histochem. Cytochem. 21, 166-174 (1973)

FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, T.; JOH, T. H.:
Immunohistochemical localization of dopamine ß-hydroxylase in the peripheral and central nervous system.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1, 627-636 (1970)

GEFFEN, L. B.; LIVETT, B. G.; RUSH, R. A.:

Immunohistochemical localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve impulses.

In: New aspects of storage and release mechanisms of catecholamines.
Eds. H. J. SCHÜMANN and G. KRONEBERG. Berlin-Heidelberg-New York: 1970. p. 58-72

GIBB, J. W.; SPECTOR, S.; UDENFRIEND, S.:

Production of antibodies to dopamine ß-hydroxylase of bovine adrenal medulla.

Mol. Pharmacol. 3, 473-478 (1967)

GOLDFISCHER, S.; ESSNER, E.:

Further observations on the peroxidatic activities of microbodies (peroxisomes).

J. Histochem. Cytochem. 17, 681-685 (1969)

GRAHAM, R. C.; KARNOVSKY, M. J.:

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; ultrastructural chemistry by a new technique.

J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302 (1966)

GRAHAM, R. C.; LUNDHOLM, U.; KARNOVSKY, M. J.:

Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole (Letter).

J. Histochem. Cytochem. 13, 150-152 (1965)

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S.:

Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428 (1976)

GRZANNA, R.; COYLE, J. T.:

Rat adrenal dopamine ß-hydroxylase: purification and immunologic characteristics.

J. Neurochem. 27, 1091-1096 (1976)

GRZANNA, R.; MOLLIVER, M. E.; COYLE, J. T.:

Visualization of central noradrenergic neurons in thick sections by the unlabelled antibody method: a transmitter-specific Golgi image.

Proc. Natl. Sci. USA 75, 2502-2506 (1976)

HALLIDAY, D.; DAVEY, F. R.; CALL, F.; MARUCCI, A. A.:
Identification of intracellular immunoglobulin in extramedullary myeloma.
Arch. Pathol. Lab. Med. 101, 522-525 (1977)

HALMI, N. S.; DUELLO, T.:
"Acidophilic" pituitary tumors. A reappraisal with differential staining and immunocytochemical techniques.
Arch. Pathol. Lab. Med. 100, 346-351 (1976)

HALMI, N. S.; PARSONS, J. A.; ERLANDSEN, S. L.; DUELLO, T.:
Prolactin and growth hormone cells in the human hypophysis: A study with immunoenzyme histochemistry and differential staining.
Cell Tissue Res. 158, 497-507 (1975)

HARTMAN, B. K.:
Immunofluorescence of dopamine ß-hydroxylase. Application of improved methodology to the localization of the peripheral and cental noradrenergic nervous system.
J. Histochem. Cytochem. 21, 321-331 (1973)

HARTMAN, B. K.; UDENFRIEND, S.:
Immunofluorescent localization of dopamine ß-hydroxylase in tissues.
Mol. Pharmacol. 6, 85-94 (1970)

HARTMAN, B. K.; UDENFRIEND, S.:
The application of immunological techniques to the study of enzymes regulating catecholamine synthesis and degradation.
Pharmacol. Rev. 24, 311-330 (1972)

HEIDELBERGER, M.; KENDALL, F. E.; SOO HOO, C. M.:
Quantitative studies on the precipitn reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo protein.
J. Exp. Med. 58, 137-152 (1933)

HÖRTNAGEL, H.; HÖRTNAGEL, H.; WINKLER, H.:
Bovine splenic nerve: characterization of noradrenaline-containing vesicles and other cell organelles by density gradient centrifugation.
J. Physiol. (London) 205, 103-114 (1969)

HÖRTNAGEL, H.; WINKLER, H.; LOCKS, H.:

Membrane protein chromaffin granules. Dopamine ß-hydroxylase, a major constituent.

Biochem. J. 129, 187-195 (1972)

HUANG, S.:

Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections.

Lab. Invest. 33, 88-95 (1975)

KIRSHNER, N.:

Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla.

J. Biol. Chem. 237, 2311-2317 (1962)

KÖNIG, R.:

Consecutive demonstration of catecholamines and dopamine ß-hydroxylase within the same specimen.

Histochemistry 61, 301-305 (1979)

KUHLMANN, W. D.; AVRAMEAS, S.:

Glucose oxidase as an antigenic marker for light and electron microscopic studies.

J. Histochem. Cytochem. 19, 361-368 (1971)

LAGERCRANTZ, H.:

Isolation and characterization of sympathetic nerve trunc vesicles.

Acta. Physiol. Scand., Suppl. 366, 1-44 (1971)

MARRACK, J.:

Nature of antibodies.

Nature (London) 133, 292-293 (1934)

MASON, T. E.; PHIFER, R. F.; SPICER, S. S.; et al.:

An immunoglobulin-enzyme bridge method for localization tissue antigens.

J. Histochem. Cytochem. 17, 563-569 (1969)

MAUNSBACH, A. B.:

The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. 1. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmium tetroxide fixatives.

J. Ultrastruc. Res. 15, 242-282 (1966)

MODESTO, R. R.; PESCE, A. J.:

The reaction of 4,4'-difluoro-3,3-y-globulin and horseradish peroxidase.

Biochem. Biophys. Acta 229, 384-395 (1971)

MORRISON, J. H.; GRZANNA, R.; MOLLIVER, M. E.; COYLE, J. T.:

The distribution and orientation of noradrenergic fibers in neocortex of the rat: an immunofluorescence study.

J. Comp. Neur. 181, 17-40 (1978)

NAGATSU, I.:

Localization of dopmine ß-hydroxylase in bovine adrenal gland and rat sciatic nerves by the improved enzyme-immunocytochemical and enzyme-immunofluorescent methods.

Acta Histochem. Cytochem. 7, 147-157 (1974)

NAGATSU, I.; KONDO, Y; INAGAKI, S.; KARASAWA, N.; KATA, T.; NAGATSU, T.:

Immunofluorescent studies on tyrosine hydroxylase: application for its axoplasmatic transport.

Acta Histochem. Cytochem. 10, 494-499 (1977)

NAGATSU, I.; KONDO, Y.; INAGAKI, S.; KOJIMA, H.; NAGATSU, T.:

Immunofluorescent and biochemical studies on tyrosine hydroxylase and dopamine ß-hydroxylase of the bullfrog sciatic nerves.

Histochemistry 61, 103-109 (1979)

OKA, M.; KAJIKAWA, K.; OHUCHI, T.; YOSHIDA, H.; IMAIZUMI, R.:

Distribution of dopamine ß-hydroxylase in subcellular fractions of adrenal medulla.

Life Sci. 6, 461-465 (1967)

OUCHTERLONY, O.:

Antigen-antibody reactions in gels.

Ark. Kem. Mineral. Geol. 26 B, 1-9 (1948)

PEARSE, A. G. E.:

Immunocytochemistry.

In: Histochemistry. Theoretical and applied; vol. 1: Preparative and optical technology.
Fourth edition. Edingburgh-London-New York: Churchill Livingstone, 1980. p. 159-252

PICH, A.; BUSSOLATI, G.; CARBONARA, A.:

Immunocytochemical detection of casein and casein-like proteins in human tissues.

J. Histochem. Cytochem. 24, 940-947 (1976)

PINKUS, G. S.; SAID, J. W.:

Specific identification if intracellular immunoglobulin in paraffin sections of multiple myeloma and macroglobulinemia using an immunoperoxidase technique.

Am. J. Pathol. 87, 47-57 (1977)

REINER, L.:

On the chemical alteration of purified antibody-proteins.

Science 72, 483-484 (1930)

RODA, L. G.; NOLAN, J. A.; KIM, S. U.; HOGUE-ANGELETTI, R. A.:

Isolation and characterization of chromaffin granules from a pheochromocytoma (PC 12) cell line.

Exp. Cell Res. 128, 103-109 (1980)

SAGE, H. J.; SMITH, W. S.; KIRSHNER, N.:

Mechanism of secretion from the adrenal medulla.
I. A microquantitative immunologic assay for bovine adrenal catecholamine storage vesicle protein and its application to studies of secretory process.

Mol. Pharmacol. 3, 81-89 (1967)

SCHIEBLER, T. H.; WINCKLER, J.:

On the vegetative cardiac innervation.

In: Progress in brain research; vol. 34.
Ed. O. ERÄNKÖ. Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Company, 1971. p. 405

STERNBERGER, L. A.:

Immunocytochemistry.
Second edition. Eds. S. COHEN and R. T. McCLUSKEY. New York-Chichester-Brisbane-Toronto: John Wiley & Sons, 1979. p. 1-354

STERNBERGER, L. A.; HARDY, P. H.; CUCULIS, J. J.; et al.:

The antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horse= radish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.

J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333 (1970)

STJÄRNE, L.:

The synthesis, uptake and storage of catecholamines in the adrenal medulla. The effect of drugs.

In: Catecholamines. Handbook of experimental pharmacology; vol. XXXIII.
Eds. H. BLASCHKO and E. MUSCHOLL. Berlin: Springer, 1972.
p. 231-269

STRAUS, W.:

Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures.

J. Histochem. Cytochem. 19, 682-688 (1971)

TAYLOR, C. R.; BURNS, J.:

The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin containing cells in formalin fixed paraffin embedded tissues.

J. Clin. Pathol. 27, 14-20 (1974)

VAN DER PLOEG, M.; VAN DUIJN, P.:

5,6-dihydroxyindol as a substrate in a histochemical peroxidase reaction.

J. roy. micr. Soc. 83, 415-423 (1964)

VERHOFSTAD, A. A. J.; HÖKFELT, T.; GOLDSTEIN, M.; STEINBUSCH, H. W. M.; JOOSTEN, H. W. J.:

Appearance of tyrosine hydroxylase, aromatic amino-acid decarboxylase, dopamine ß-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase during the ontogenesis of the adrenal medulla. An immunohistochemical study in the rat.

Cell Tissue Res. 200, 1-13 (1979)

VIVEROS, O. H.; ARGUEROS, L.; KIRSHNER, N.:

Release of catecholamines and dopmine ß-hydroxylase from the adrenal medulla.

Life Sci. 7, 609-618 (1968)

VLADUTIU, G. D.; BIGAZZI, P. E.; ROSE, N. R.:

Localization of a primate-specific esterase using immuno=fluorescent and immunoperoxidase techniques.

J. Histochem. Cytochem. 21, 559-567 (1973)

WELLER, T. H.; COONS, A. H.:

Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (New York) 86, 789-794 (1954)

WICK, G.; BAUDNER, S.; HERZOG, F.:

Immunfluoreszenz.
Marburg/Lahn: Die Medizinische Verlagsgesellschaft, 1976.
p. ?-120

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Borchard möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für seine wohlwollende Förderung danken.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Bojar und Herrn Doktor Koldovsky für die Hilfe bei der Isolation der chromaffinen Granula.

Auch sei Frau Ernser für die technische Assistenz bei der Herstellung der Schnittpräparate und Herrn Basler für die praktische Assistenz bei den Tier= experimenten gedankt.

Lebenslauf

25. August 1957	geboren in Mönchengladbach. Mein Vater, Walter Borchard, ist Dipl.-Physiker; meine Mutter, Eleonore Borchard, geb. Wolf, arbeitet als Amtsrätin.
April 1964	Volksschule Frankfurter Straße, Mönchengladbach 2
September 1967	Hugo-Junkers-Gymnasium, Mönchengladbach 2
Juni 1976	Abitur
Oktober 1976	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf
August 1978	Ärztliche Vorprüfung
August 1979	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1981	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Zur Zeit befinde ich mich im Praktischen Jahr an der Universitätsklinik Düsseldorf. Der erste Abschnitt in meinem Wahlfach Dermatologie ist bereits beendet (19.10.81-7.2.82). Es schließt sich eine Ausbildung in Innerer Medizin (bis 29.5.82) und Chirurgie (bis 17.9.82) an.
	Bis einschließlich Dezember 1982 ist der Dritte Abschnitt der Ärztlichen Prüfung beendet.